



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0081685

(43) 공개일자 2015년07월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0001415

(22) 출원일자 2014년01월06일

심사청구일자 2014년01월06일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

심상준

서울특별시 강남구 선릉로 221 도곡렉슬아파트 301동 803호

김경규

경기 수원시 장안구 화산로 85, 120동 1103호 (천천동, 천천푸르지오아파트)

전호준

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 화공생명공학과

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 7 항

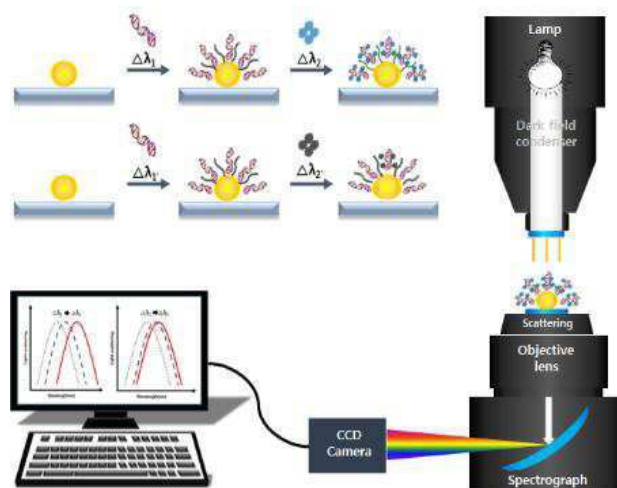
(54) 발명의 명칭 단일 나노 플라즈모닉 센서를 이용한 DNA와 p53 단백질과의 상호작용 분석방법

(57) 요약

본 발명은 단일 나노 플라즈모닉 센서(Single Plasmonic Nanosensor)를 이용한 DNA와 p53 단백질과의 상호 작용을 효과적으로 분석하는 방법으로, 더욱 상세하게는 단일 금 나노입자가 고정되어 있는 고정되어 있는 센서를 이용하여 GADD45 promoter와 결합하는 야생형 및 돌연변이형 p53 단백질의 상호작용과 결합력의 차이를 분석하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 단일 나노 플라즈모닉 센서를 이용한 분석 방법은, 특정 promoter와 결합하는 p53 단백질의 상호작용 및 결합력의 차이를 별도의 표지과정 없이 직접적인 분석이 가능하며, 야생형과 돌연변이형 p53 단백질의 결합력의 비교를 통해 아미노산의 변이에 따른 각 부위의 중요도 파악이 가능하므로, 종양발생 가능성이 높은 환자를 조기 진단하는 분석 분야에 적용 및 응용할 수 있다.

대표도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013R1A2A1A01015644
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	생물공정의 실시간 고속 모니터링을 위한 나노 플라즈몬 검지 플랫폼 기술 개발
기 여 율	5/10
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2013.06.01 ~ 2014.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	20100027955
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	선도연구센터지원사업
연구과제명	생리활성물질 전달용 생체소재 연구
기 여 율	2/10
주관기관	성균관대학교 산학협력단
연구기간	2013.09.01 ~ 2014.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	20110031997
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	거대과학 연구개발 사업 (Korea CCS 2020사업)
연구과제명	생물학적 이산화탄소 고속 전환 유기자원화 기술
기 여 율	3/10
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2013.06.01 ~ 2014.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 GADD45 promoter-p53 단백질의 상호작용의 분석방법:

- (a) GADD45 promoter가 고정되어 있는 금 나노입자를 기반으로 한 플라즈모닉 센서에 야생형 또는 돌연변이 p53 단백질을 접촉시켜 GADD45 promoter와 p53 단백질의 결합을 유도하는 단계; 및
- (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy) 및 레일리-산란 스펙트럼(Rayleigh scattering spectrum)을 이용하여 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장 이동 값($\Delta \lambda_{\max}$) 분석을 통해 GADD45 promoter와 p53 단백질의 상호작용을 분석하는 단계.

청구항 2

다음 단계를 포함하는 GADD45 promoter-p53 단백질 결합활성의 분석방법:

- (a) GADD45 promoter가 고정되어 있는 금 나노입자를 기반으로 한 플라즈모닉 센서에 야생형 또는 돌연변이 p53 단백질을 접촉시켜 GADD45 promoter와 p53 단백질의 결합을 유도하는 단계; 및
- (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy) 및 레일리-산란 스펙트럼(Rayleigh scattering spectrum)을 이용하여 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장 이동 값($\Delta \lambda_{\max}$) 분석을 통해 GADD45 promoter와 p53 단백질의 결합활성을 분석하는 단계.

청구항 3

다음 단계를 포함하는 돌연변이 p53 단백질 검출방법:

- (a) GADD45 promoter가 고정되어 있는 금 나노입자를 기반으로 한 플라즈모닉 센서에 야생형 또는 돌연변이 p53 단백질이 포함된 시료를 접촉시켜 GADD45 promoter와 p53 단백질의 결합을 유도하는 단계; 및
- (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy) 및 레일리-산란 스펙트럼(Rayleigh scattering spectrum)을 이용하여 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장 이동 값($\Delta \lambda_{\max}$) 분석을 통해 돌연변이 p53 단백질 유무를 검출하는 단계.

청구항 4

다음 단계를 포함하는 p53 단백질 아미노산 변이에 따른 GADD45 promoter-p53 단백질의 결합활성 분석방법:

- (a) GADD45 promoter가 고정되어 있는 금 나노입자를 기반으로 한 플라즈모닉 센서에 야생형 또는 GADD45 promoter 결합 부위의 아미노산이 변이된 p53 단백질을 접촉시켜 GADD45 promoter와 p53 단백질의 결합을 유도하는 단계; 및
- (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy) 및 레일리-산란 스펙트럼(Rayleigh scattering spectrum)을 이용하여 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장 이동 값($\Delta \lambda_{\max}$) 분석을 통해 p53 단백질 아미노산 변이에 따른 GADD45 promoter와 p53 단백질의 결합활성을 분석하는 단계.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 (a) 단계의 GADD45 promoter가 고정되어 있는 금 나노입자를 기반으로 한 플라즈모닉 센서는 (i) 유리 또는 플라스틱에서 선택되는 투명한 지지체에 25 내지 35nm 크기의 금 나노입자를 고정시키는 단계; 및 (ii) 금 나노입자가 고정된 표면에 GADD45 promoter와 유기 흡착제인 $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{OH}$ 를 고정시키는 단계;를 포함하여 제조된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 GADD45 promoter와 p53 단백질의 결합을 유도하는 과정은 35 내지 45℃의 조건으로 20 내지 40분 동안 반응시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 야생형 또는 돌연변이 p53 단백질은 암세포에서 분리한 후 동일한 농도로 처리하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 단일 나노 플라즈모닉 센서(Single Plasmonic Nanosensor)를 이용한 DNA와 p53 단백질과의 상호 작용을 효과적으로 분석하는 방법으로, 더욱 상세하게는 단일 금 나노입자가 고정되어 있는 플라즈모닉 센서를 이용하여 GADD45 promoter와 결합하는 야생형 및 돌연변이형 p53 단백질의 상호작용과 결합력의 차이를 분석하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

p53 유전자는 암에서 흔히 발견되는 돌연변이 유전자이면서, 암 발생 과정에 중요한 인자로 작용하는 유전자 중 하나이다. 암 억제 유전자인 p53은 세포내 DNA에 손상이 발생하면 활성화되어, 염기절단수리(Base Excision Repair, BER) 기작을 유도하고, 세포주기를 지연시켜 손상된 유전자의 복구가 이뤄지는 동안 불완전한 유전자의 복제를 억제하고, 손상된 DNA의 복구에 관여하는 유전자이다. 또한, p53은 세포내 유전자의 손상이 복구될 수 없을 정도로 심각한 경우에는 세포사멸기전을 유도하여 암으로 변이될 가능성이 있는 세포를 미리 제거해주는 기능을 수행한다. p53은 세포내 손상된 유전자가 축적되는 것을 방지하여 손상된 세포가 암으로 발생하는 기전을 억제하는 것으로 알려져 있다 (Penka V. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:14675, 1998; S. Collot-Teixeira *et al.*, *Reviews in Medical Virology*, 14:301, 2004; David Sidransky and Monica Hollstein, *Annu. Rev. Med.*, 47:285, 1996).

[0003]

돌연변이 p53 단백질은 전체 암의 50%가 넘는 암에서 발견되고(H. Kitano, *Science.*, 295:1662, 2002), 그 중 90% 이상은 DNA 결합 도메인에 변이가 발견된다. p53 단백질이 DNA 결합 도메인의 변이로 DNA에 결합하지 못하여 전사작용을 촉진하는 작용전달인자(trans-acting)로의 기능을 잃게 되면 손상된 세포의 세포분열을 억제하지 못하여, 손상된 세포의 암세포화 가능성이 높아진다 (Pavletich NP *et al.*, *Genes & Dev.*, 7:2557, 1993; Jean-Francois Millau, *Mutation Research.*, 681:118, 2009; Wei Gu and Robert G. Roeder, *Cell*, 90:59, 1997). 따라서, 정상 p53과 돌연변이 p53 단백질의 DNA 결합 능력을 모니터링하는 것은 암세포 연구 및 진단 분야에서 그 가치가 상당히 크다고 할 수 있다.

[0004]

한편, 최근 바이오센서의 기술은 표지물질을 사용하지 않는 비표지 측정기술 개발에 초점이 맞추어져 있으며, 대표적으로는 금속 표면에서 발생하는 표면 플라즈몬 공명 현상을 이용하는 방법(R. Q. DUAN *et al.*, *Neoplasma*, 59(3):348, 2012; Wei Zhou *et al.*, *International Journal of Nanomedicine*, 6:381, 2011), 3차원 미세 구조물인 캔틸레버의 휨 현상에 의한 빛의 굴절률 변화를 측정하는 방법(Balle, MK. *et al.*, *Ultramicroscopy*, 82:1, 2000), 생체분자의 질량 변화에 따른 수정 크리스탈의 공명주파수 변화를 측정하는 방법(Marx, KA., *Biomacromolecules*, 4:1099, 2003), 반도체 공정에 기반을 둔 전기장 효과를 측정하는 방법(Yuqing, M. *et al.*, *Biotechnol. Adv.*, 21:527, 2003) 및 전기화학적 측정 방법(Hanahan, G. *et al.*, *J.*

Environ. Monit., 6; 657, 2004; Sang Hee Han *et al.*, *Analytica Chimica Acta*, 665:79, 2010) 등이 있다.

[0005] 그 중 국소 표면 플라즈몬 공명(Localized surface plasmon resonance: LSPR) 방법은 복잡한 사전 정제 및 표지화 공정 없이 정량적으로 반응을 감지할 수 있기 때문에, 표면에 고정된 생체분자 사이의 상호작용에 관한 많은 연구에서 다양하게 사용되어 왔다. LSPR 방법은 금속 나노입자와 같이 국소적인 표면이 존재하는 재료에 다양한 파장을 갖는 빛을 조사하면 벌크 금속과는 달리 금속 나노입자 표면에 분극이 발생하게 되고 전기장의 강도를 증대하는 특이한 성질을 보인다. 이러한 LSPR 광학특성은 나노입자 근처에서 발생하는 유전율(굴절율) 변화에 민감하게 응답한다. 이러한 유전율(굴절율) 변화를 이용하여 생체분자 간의 흡착을 검출하기 위해 사용될 수 있다. 지난 수십 년 동안 항원/항체, 리간드/수용체, 단백질/단백질 반응 및 DNA 혼성체화를 포함하여 특정 생체 피분석물에 대한 생체재료 농도, 두께 및 결합 반응속도 데이터를 측정하기 위하여 LSPR의 광학특성을 기초로 다양한 생체분자 상호작용 분석이 수행되어 왔다.

[0006] 표면 플라즈몬 공명 방법을 이용하여 돌연변이 p53을 검출하기 위한 종래의 기술로는, SPR을 이용하여 p53 단백질 및 p53 단백질 결합 DNA의 상호작용으로 돌연변이 p53 단백질을 검출하는 방법(Sang Hee Han *et al.*, *Analytica Chimica Acta*, 665:79, 2010), 은 나노입자가 고정된 국소 표면 플라즈몬 공명 센서(LSPR)를 이용하여 p53 유전자와 p53 유전자에 상호작용으로 결합가능한 DNA 프로브의 상호작용을 이용하여 돌연변이 p53 유전자를 검출하는 방법(R. Q. DUAN *et al.*, *Neoplasma*, 59(3):348, 2012) 및 은 나노입자 위에 p53 결합 가능 항체(anti-p53 antibody)를 고정시킨 다음, p53 단백질이 포함되어 있는 혈청을 처리하고 항체에 p53 단백질이 결합했을 때의 LSPR 파장 변화를 측정하여 혈청 속에 포함되어 있는 p53 단백질을 검출하는 방법(Wei Zhou *et al.*, *International Journal of Nanomedicine*, 6:381, 2011) 등이 있다.

[0007] 하지만, 대부분의 p53 단백질의 돌연변이는 DNA 결합 도메인의 중앙에 위치하는 특정 사이트에서 주로 발생하기 때문에 기존의 방법들은 민감도와 특이성이 낮고, 비용이 비싸고 소요시간이 많이 드는 문제점이 있다 (Alex N Bullock *et al.*, *Oncogene.*, 19:1245, 2000; Uma Chandrachud and Susannah, *Technol Cancer Res Treat.*, 8:445, 2009).

[0008] 본 발명자들은 이전의 연구에서 금 나노입자가 고정되어 있는 표면 플라즈몬 공명 센서를 개발하여 DNA와 단백질의 상호작용 및 결합활성을 분석한 적이 있으며, 전사를 통해 합성된 RNA의 양을 측정하지 않고도 DNA와 단백질의 상호작용을 관찰하여 별도의 표지과정 없이 프로모터의 활성을 측정할 수 있는 것을 확인하였다 (Min Sun Song *et al.*, *Adv. Mater.*, 25:1265, 2013).

[0009] 이에, 본 발명자들은 보다 정확하고 민감한 돌연변이 p53 단백질의 검출방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 단일 금 나노입자가 고정되어 있는 플라즈모닉 센서를 이용하여 p53 단백질 DNA 결합 도메인에 특이적인 염기서열을 갖는 GADD45 promoter와 결합하는 야생형 및 돌연변이형 p53 단백질의 상호작용과 결합력의 차이를 분석하면, 기존의 방법보다 정확하고 빠르게 저농도의 변이 p53 단백질을 검출할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 금 나노입자가 고정된 표면 플라즈몬 공명 센서를 이용하여 GADD45 promoter-p53 단백질 상호작용 및 결합활성을 분석하는 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, (a) GADD45 promoter가 고정되어 있는 금 나노입자를 기반으로 한 플라즈모닉 센서에 야생형 또는 돌연변이 p53 단백질을 접촉시켜 GADD45 promoter와 다량의 p53 단백질의 결합을 유도하는 단계; 및 (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy) 및 레일리-산란 스펙트럼(Rayleigh scattering spectrum)을 이용하여 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장 이동 값($\Delta \lambda_{\max}$) 분석을 통해 GADD45 promoter와 다량의 p53 단백질의 상호작용을 분석하는 단계를 포함하는 GADD45 promoter-p53 단백질의 상호작용의 분석방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, (a) GADD45 promoter가 고정되어 있는 금 나노입자를 기반으로 한 플라즈모닉 센서에 야생형 또는 돌연변이 p53 단백질을 접촉시켜 GADD45 promoter와 p53 단백질의 결합을 유도하는 단계; 및 (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy) 및 레일리-산란 스펙트럼(Rayleigh scattering spectrum)을 이용하여 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장 이동 값($\Delta \lambda_{\max}$) 분석을 통해 GADD45 promoter와 p53 단백질의 결합활성을 분석하는 단계를 포함하는 GADD45 promoter-p53 단백질 결합활성의 분석방법을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, (a) GADD45 promoter가 고정되어 있는 금 나노입자를 기반으로 한 플라즈모닉 센서에 야생형 또는 돌연변이 p53 단백질이 포함된 시료를 접촉시켜 GADD45 promoter와 p53 단백질의 결합을 유도하는 단계; 및 (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy) 및 레일리-산란 스펙트럼(Rayleigh scattering spectrum)을 이용하여 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장 이동 값($\Delta \lambda_{\max}$) 분석을 통해 돌연변이 p53 단백질 유무를 검출하는 단계를 포함하는 돌연변이 p53 단백질 검출방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, (a) GADD45 promoter가 고정되어 있는 금 나노입자를 기반으로 한 플라즈모닉 센서에 야생형 또는 GADD45 promoter 결합 부위의 아미노산이 변이된 p53 단백질을 접촉시켜 GADD45 promoter와 p53 단백질의 결합을 유도하는 단계; 및 (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy) 및 레일리-산란 스펙트럼(Rayleigh scattering spectrum)을 이용하여 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장 이동 값($\Delta \lambda_{\max}$) 분석을 통해 p53 단백질 아미노산 변이에 따른 GADD45 promoter와 p53 단백질의 결합활성을 분석하는 단계를 포함하는 p53 단백질 아미노산 변이에 따른 GADD45 promoter-p53 단백질의 결합활성 분석방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 단일 나노 플라즈모닉 센서를 이용한 분석 방법은, 특정 promoter와 결합하는 p53 단백질의 상호작용 및 결합력의 차이를 별도의 표지과정 없이 직접적인 분석이 가능하며, 야생형과 돌연변이형 p53 단백질의 결합력의 비교를 통해 아미노산의 변이에 따른 각 부위의 중요도 파악이 가능하므로, 종양발생 가능성이 높은 환자를 조기 진단하는 분석 분야에 적용 및 응용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1a는 단일 나노 플라즈모닉 센서를 이용한 DNA와 p53 단백질과의 상호 작용을 분석하는 전체적인 과정을 도식화한 개략도이다.

도 1b는 단일 나노 플라즈모닉 센서의 실제 모델 이미지를 나타낸 것이다.

도 2a는 HAuCl_4 용액을 소듐 시트레이트로 환원시킴으로써 만든 약 30nm 크기의 금 입자 TEM 이미지이다.

도 2b는 1000배율에서 금 나노입자(30nm)의 암시야 이미지이다.

도 3는 금 나노입자에 생체물질의 부착에 따른 UV 흡수 스펙트럼 결과를 나타낸 것이다.

도 4a는 단일 금 나노입자가 고정된 플라즈모닉 센서에 promoter와 쥐의 야생형 (wild type) p53 단백질과의 결합으로 인한 빛 산란 스펙트럼의 이동을 나타낸 것이다.

도 4b는 단일 금 나노입자가 고정된 플라즈모닉 센서에 promoter와 쥐의 돌연변이형(mutant type) p53 단백질과의 결합으로 인한 빛 산란 스펙트럼의 이동을 나타낸 것이다.

도 5는 쥐의 p53 DNA binding domain의 선택적인 돌연변이로 인한 promoter와의 결합률을 금 나노입자의 최대 파장 이동 값을 통해 비교한 그래프이다.

도 6a는 다양한 종류의 유방암 p53 단백질의 GADD45 promoter와의 결합률을 금 나노입자의 최대 파장 이동 값을 통해 비교한 그래프이다.

도 6b는 다양한 종류의 폐암 p53 단백질의 GADD45 promoter와의 결합률을 금 나노입자의 최대 파장 이동 값을 통해 비교한 그래프이다.

도 7a는 다양한 종류의 유방암 p53 단백질의 상대적인 농도 값을 비교한 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent

Assay) 실험 결과 그래프이다.

도 7b는 다양한 종류의 폐암 p53 단백질의 상대적인 농도 값을 비교한 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 실험 결과 그래프이다.

도 8은 GADD45 promoter와 p53 DNA binding domain의 결합력의 차이를 분석한 EMSA(Electrophoretic mobility shift assays) 실험결과를 나타낸 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0018] 본 발명은 일 관점에서, (a) GADD45 promoter가 고정되어 있는 금 나노입자를 기반으로 한 플라즈모닉 센서에 야생형 또는 돌연변이 p53 단백질을 접촉시켜 GADD45 promoter와 p53 단백질의 결합을 유도하는 단계; 및 (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy) 및 레일리-산란 스펙트럼(Rayleigh scattering spectrum)을 이용하여 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장 이동 값($\Delta \lambda_{\max}$) 분석을 통해 GADD45 promoter와 p53 단백질의 상호작용을 분석하는 단계를 포함하는 GADD45 promoter-p53 단백질의 상호작용의 분석방법에 관한 것이다.
- [0019] 본 발명은 다른 관점에서, (a) GADD45 promoter가 고정되어 있는 금 나노입자를 기반으로 한 플라즈모닉 센서에 야생형 또는 돌연변이 p53 단백질을 접촉시켜 GADD45 promoter와 p53 단백질의 결합을 유도하는 단계; 및 (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy) 및 레일리-산란 스펙트럼(Rayleigh scattering spectrum)을 이용하여 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장 이동 값($\Delta \lambda_{\max}$) 분석을 통해 GADD45 promoter와 p53 단백질의 결합활성을 분석하는 단계를 포함하는 GADD45 promoter-p53 단백질 결합활성의 분석방법에 관한 것이다.
- [0020] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) GADD45 promoter가 고정되어 있는 금 나노입자를 기반으로 한 플라즈모닉 센서에 야생형 또는 돌연변이 p53 단백질이 포함된 시료를 접촉시켜 GADD45 promoter와 p53 단백질의 결합을 유도하는 단계; 및 (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy) 및 레일리-산란 스펙트럼(Rayleigh scattering spectrum)을 이용하여 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장 이동 값($\Delta \lambda_{\max}$) 분석을 통해 돌연변이 p53 단백질 유무를 검출하는 단계를 포함하는 돌연변이 p53 단백질 검출방법에 관한 것이다.
- [0021] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) GADD45 promoter가 고정되어 있는 금 나노입자를 기반으로 한 플라즈모닉 센서에 야생형 또는 GADD45 promoter 결합 부위의 아미노산이 변이된 p53 단백질을 접촉시켜 GADD45 promoter와 p53 단백질의 결합을 유도하는 단계; 및 (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy) 및 레일리-산란 스펙트럼(Rayleigh scattering spectrum)을 이용하여 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장 이동 값($\Delta \lambda_{\max}$) 분석을 통해 p53 단백질 아미노산 변이에 따른 GADD45 promoter와 p53 단백질의 결합활성을 분석하는 단계를 포함하는 p53 단백질 아미노산 변이에 따른 GADD45 promoter-p53 단백질의 결합활성 분석방법에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명은 단일 나노 플라즈모닉 센서를 이용한 GADD45 promoter와 p53 단백질과의 상호작용을 분석하는 방법에 관한 것으로, 특히, 단일 금 나노입자를 사용하여 GADD45 promoter를 결합 및 고정화시키고, 상기 GADD45 promoter에 결합하는 p53 단백질의 결합을 유도하여 야생형 및 돌연변이에 따른 상호작용 또는 결합력의 차이를 분석하는 방법을 제공한다.
- [0023] 본 발명에서는 단일 나노 플라즈모닉 센서를 이용한 DNA와 p53 단백질과의 상호작용 분석방법을 제공하기 위해 p53 단백질에 특이적인 DNA로 GADD45 promoter를 사용한 것으로, 이에 한정되지 않고 당업계에 공지된 p53 단백질에 특이적인 DNA 또는 promoter를 사용하여 p53 단백질과의 상호작용 또는 결합력을 측정할 수 있다.
- [0024] 상기 p53 단백질은 GADD45 프로모터(promoter)에 결합하여 GADD45의 발현량을 증가시켜, cyclin-CDK complex의 저해를 유도하는 것으로 알려져 있으며, p53 단백질 결합 도메인인 GADD45 promoter는 약 30bp의 보존서열(conserved sequence)을 가지고있어 돌연변이 p53 단백질과의 결합능력을 분석하여 초기 암 진단에 사용 가능하다.

- [0025] 또한, 본 발명은 p53 단백질의 결합력의 차이를 분석함으로써, 암 발생의 생성과 억제에 중요한 역할을 하는 p53 단백질의 돌연변이 여부를 분석할 수 있으며, p53 단백질 아미노산 변이에 따른 GADD45 promoter와의 결합력 차이(최대 파장 이동 값 비교)를 통해 p53 단백질의 DNA 결합 도메인의 중요한 돌연변이 위치를 구분하고 분석할 수 있다. 특히, 특정 promoter와 결합하는 p53 단백질의 상호작용을 별도의 표지과정 없이 직접적인 분석이 가능하고, 플라스모닉 센서를 이용한 단백질의 아미노산의 변이에 따른 각 부위의 중요도의 파악이 가능하다는 장점이 있다.
- [0026] 본 발명에서는 GADD45 promoter와 p53 단백질의 상호작용 또는 결합력의 차이를 분석하기 위해 야생형 p53 단백질과 함께 DNA binding 부위의 변이가 있는 p53 단백질을 사용하였다. 이를 위해 쥐에서 얻은 야생형과 돌연변이형 p53 단백질(표 1)과 사람의 유방암 세포주(표 2), 폐암 세포주(표 3)에서 각각 얻은 야생형과 돌연변이형 p53 단백질을 분리하여 GADD45 promoter와의 상호작용 또는 결합력 차이를 분석하였다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 GADD45 promoter가 고정되어 있는 금 나노입자를 기반으로 한 플라스모닉 센서는 (i) 유리 또는 플라스틱에서 선택되는 투명한 지지체에 25 내지 35nm 크기의 금 나노입자를 고정시키는 단계; 및 (ii) 금 나노입자가 고정된 표면에 GADD45 promoter와 유기 흡착제인 $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{OH}$ 를 고정시키는 단계;를 포함하여 제조된 것을 특징으로 한다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계에서 GADD45 promoter와 p53 단백질의 결합을 유도하는 과정은 35 내지 45℃의 조건으로 20 내지 40분 동안 반응시키는 것을 특징으로 한다.
- [0029] 본 발명의 실시예에서, 표면 플라스몬 공명 현상을 기반으로 한 GADD45 promoter-p53 단백질 상호작용 분석용 센서를 제작하기 위해서 약 30nm 정도의 금 나노입자를(도 2a 및 도 2b) 당업계에 공지된 방법으로 합성한 다음(도 2a), 유리 기판 위에 고정시키고, 상기 금 나노입자가 고정된 유리 기판을 이미징 챔버(RC-30, Warner Instrument Inc.)에 장착시키고, 이 이미징 챔버는 암시야 공명 현미경의 샘플 홀더에 삽입하였다. 그 다음 챔버 안으로 GADD45 promoter제 $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{OH}$ 가 1 : 8의 몰 비율로 혼합된 혼합물을 주입하여 12시간 동안 반응시킴으로써 GADD45 promoter를 금 나노 입자 표면에 고정화시켰다. 금 나노입자 표면 개질 정도를 UV/VIS 분광 광도계로 측정한 결과(도 3), 개질하지 않은 금 나노입자 → 표면 개질된 금 나노입자 → DNA가 고정된 금 나노입자 순으로 장파장 쪽으로 피크가 이동된 것을 확인하였다.
- [0030] 본 발명의 방법으로 제조한 나노플라스모닉 센서에서 금 나노입자에 고정된 GADD45 promoter와 p53 단백질의 결합 정도를 비교하기 위해 쥐에서 분리한 야생형 p53 단백질 및 돌연변이 p53 단백질을 챔버에 주입하고 2시간 동안 반응시켜 DNA와 단백질간의 결합을 유도하였다. 고정화가 이루어지는 각 단계마다 암시야 공명 현미경을 이용한 광 산란(Light scattering) 스펙트럼을 측정하여 최대 파장 값을 결정하였다. 그 결과, 고정화 단계마다 최대 파장이 오른쪽으로 이동함을 확인하였으며(도 4a 및 도b), 이러한 파장의 이동은 DNA와 단백질의 결합에 따른 단일 금 나노입자 주위의 굴절률변화에서 기인한 것으로 단일 금 나노입자에 프로모터 및 선택적으로 결합하는 단백질이 부착됨으로써 유전환경이 변하고 그에 따라 스펙트럼의 파장 값이 흡착 단계마다 장파장으로 이동하는 것을 알 수 있다. 즉, 최대파장의 이동도 분석을 통해 결과적으로 GADD45 promoter에 결합하는 p53 단백질과의 상호작용을 비교 분석할 수 있다.
- [0031] 또한, 다양한 p53 단백질의 상호작용 또는 결합력을 정확하게 측정하기 위해, background 스펙트럼과 암시야 공명 현미경 자체의 기계적으로 발생하는 노이즈 시그널을 측정하여 이를 제거한 스펙트럼 분석을 실시하였으며, 단일 금 나노입자의 주위 굴절률 변화로부터 얻어진 LSPR 산란 최대 파장 이동 값($\lambda_{\max}$)은 하기 수학적 식 1로 계산하였다.
- [0032] [수학적 식 1]
- [0033]
$$\Delta \lambda_{\max} = \lambda_{\max} (\text{after binding}) - \lambda_{\max} (\text{before binding})$$
- [0034] GADD45 promoter가 고정되어 있는 나노플라스모닉 센서에 쥐의 p53 단백질 및 사람의 유방암 세포주, 폐암 세포주에서 분리한 p53 단백질을 결합시키고, 스펙트럼을 측정하여 상기 수학적 식 1을 이용하여 단일 금 나노입자의 주위 굴절률 변화로부터 얻어진 LSPR 산란 최대 파장 이동 값($\lambda_{\max}$)을 계산하였다.

- [0035] 쥐의 p53 단백질의 최대파장 이동 값을 비교한 결과, 야생형 p53 단백질의 경우 스펙트럼의 최대 파장 값이 9.6nm 이동한 것을 확인하였으며, 돌연변이 p53 단백질(I252F 및 R270H)의 경우 스펙트럼의 최대 파장 값이 각각 4.2nm, 1.7nm가 이동하는 것을 확인하였다 (도 5 및 표 4).
- [0036] 사람 유방암 세포주의 p53 단백질의 최대파장 이동 값을 비교한 결과, ZR-75-1 및 MCF-7 세포주에서 분리한 야생형 p53 단백질의 경우 스펙트럼의 최대 파장 값이 각각 8.6nm 및 9.3nm 이동한 것을 확인하였으며, T47D, BT474, SKBR3, MDA-MB-231 및 MDA-MB-435s에서 분리한 돌연변이 p53 단백질의 경우 스펙트럼의 최대 파장 값이 각각 1.2nm, 1.0nm, 0.64nm, 2.66nm 및 2.1nm 이동한 것을 확인하였다 (도 6a 및 표 5). 또한, 사람 폐암 세포주의 p53 단백질의 최대파장 이동 값을 비교한 결과, H460 세포주에서 분리한 야생형 p53 단백질의 경우 스펙트럼의 최대 파장 값이 15nm 이동한 것을 확인하였으며, H522, H441, Calu-3 및 H1703에서 분리한 돌연변이 p53 단백질의 경우 스펙트럼의 최대 파장 값이 각각 2.05nm, 3.9nm, 2.9nm, 2.66nm 및 2.4nm 이동한 것을 확인하였다 (도 6b 및 표 5).
- [0037] 상기 결과 값을 비교해 보면, p53 단백질 아미노산 변이에 따라 스펙트럼 파장의 이동 값이 각각 다른 것을 확인할 수 있으며, 이는 GADD45 promoter의 결합력의 차이로 인해 발생한 것으로, p53 단백질의 DNA 결합 도메인의 중요한 돌연변이 위치를 구분하고 분석할 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 사용된 유방암 p53 단백질 돌연변이 샘플 중 SKBR3의 경우 DNA 결합 도메인 175 위치(DNA binding domain 175 position)에서 아미노산 아르기닌(arginine)이 히스티딘(histidine)으로 변이가 일어난 것이다. 이 부위는 p53 DNA binding domain의 다른 부위보다 프로모터와의 결합에 더욱 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 중요한 기능을 가진 부위의 돌연변이가 일어남으로써 프로모터와의 결합력이 다른 돌연변이형 단백질보다도 현저히 떨어지게 되며, 이는 스펙트럼 파장 이동의 결과로 확인이 가능하다.
- [0039] 또한 본 발명에서 사용된 폐암 p53 단백질 돌연변이 샘플 중 H522의 경우 DNA 결합 도메인 191 위치(DNA binding domain 191 position)의 p53이 유전자 결손(deletion)으로 유전자가 knock down 되어 p53 단백질의 발현이 없다. 그러므로 다른 돌연변이형 단백질보다 결합력이 현저히 떨어지며, 가장 낮은 최대파장 이동 값을 보이는 것을 확인하였다.
- [0040] 즉, 돌연변이 p53 단백질과 야생형 p53 단백질의 최대파장 이동 값을 비교하여 수치화하였을 경우(Compare with $\Delta \lambda_{\max}$), 가장 높은 값을 보이는 샘플이 중요한 부분에 돌연변이가 일어났다는 것을 의미하며, 본 발명의 나노 플라즈모닉 센서를 이용하여 p53 단백질의 중요한 돌연변이 위치를 파악할 수 있는 것을 확인하였다.
- [0041] 본 발명의 돌연변이 p53 단백질에 따른 최대파장 이동 값의 차이가 결합력의 차이로 발생한 것으로, 샘플 속에 포함된 p53 단백질의 농도 차이가 아니라는 것을 확인하기 위해 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 실험을 통해 정량화한 결과(도 7a 및 7b), 각 샘플마다 농도의 큰 차이는 발견되지 않았으며, 특정 샘플의 p53 농도가 높아서 광 산란 스펙트럼 최대 파장 값의 차이가 생기는 것이 아니라 단백질 변형의 유, 무에 따라 결합력 차이가 발생하는 것을 확인하였다.
- [0042] 나아가, 유방암 야생형 p53 단백질과 폐암 야생형 p53 단백질의 광산란 스펙트럼 최대 파장의 이동 값 차이가 발생하는 이유는 폐암의 야생형 p53 단백질의 농도가 유방암 야생형 p53 단백질 보다 높기 때문이라는 것을 확인하였다.
- [0043] 또한, 나노 플라즈모닉 센서를 통해 얻은 GADD45 promoter-p53 단백질의 결합력 차이의 정당성을 확인하기 위해 EMSA(Electrophoretic mobility shift assays) 실험을 통해 쥐 p53 단백질의 결합력의 차이를 비교한 결과, 나노 플라즈모닉 센서의 광산란 분석 결과와 일치하는 것을 확인하였다. 이를 통해 나노 플라즈모닉 센서가 프로모터와 단백질(야생형, 돌연변이형)의 결합력의 차이를 보다 빠르고 정확하게 분석할 수 있다는 것을 확인하였다.
- [0044] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예 1

[0045] 야생형 및 돌연변이 p53 단백질 분리

[0046] 본 실험에서 사용된 p53 단백질은 쥐에서 얻은 야생형과 돌연변이형 단백질과 사람의 유방암, 폐암 세포주에서 각각 얻은 야생형과 돌연변이형 p53 단백질을 사용하였으며, 이들의 구성성분은 표 1 내지 표 3에 나타내었다.

[0047]

표 1

[0048] 쥐 유래 p53 단백질의 DNA 결합 도메인에 대한 정보

Name	Conc. (ug/ul)	Pos.	WT	Mut	AA	Mut
p53 wild type	12	-	-	-	-	-
I252F	4	252	ATT	TTT	Ile	Phe
R270H	5	270	CGC	CAC	Arg	His

표 2

[0049] 인간 유래 p53 단백질의 DNA 결합 도메인에 대한 정보 - 유방암 샘플

Name	Conc. (ug/ul)	Pos.	WT	Mut	AA	Mut
ZR-75-1	5.8	-	-	-	-	-
MCF-7	6.2	-	-	-	-	-
T47D	7.1	194	CTT	TTT	Leu	Phe
BT474	3.5	282	GAG	AAG	Glu	Lys
SKBR3	5.7	175	CGC	CAC	Arg	His
MDA-MB-231	5.7	280	AGA	AAA	Arg	Lys
MDA-MB-435s	8.3	266	GGA	GAA	Gly	Glu

표 3

[0050] 인간 유래 p53 단백질의 DNA 결합 도메인에 대한 정보 - 폐암 샘플

Name	Conc. (ug/ul)	Pos.	WT	Mut	AA	Mut
H460	3.5	-	-	-	-	-
H522	3.3	191	CCT	della	Pro	Fs.
H441	4.3	158	CGC	CTC	Arg	Leu
Calu-3	3.9	237	ATG	ATT	Met	Ile
H1703	5.1	285	GAG	AAG	Glu	Lys

[0051] 상기 세포주에서 당업계 알려진 단백질 분리 방법을 사용하여 p53 단백질을 분리하였다.

실시예 2

[0052] 금 입자의 제조 및 유리 기판 위에 금 나노 입자 고정과 챔버 세팅(chamber setting)

[0053] 본 발명의 표면 플라즈몬 공명 현상을 기반으로 한 GADD45 promoter-p53 단백질 상호작용 검출용 센서를 제작하기 위해서 약 30nm 정도의 금 나노입자를(도 2a 및 도 2b) 당업계에 공지된 방법으로 합성하였다 (Min Sun Song *et al.*, *Adv. Mater.*, 25:1265, 2013). 제조된 금 나노 입자들은 커버슬립 슬라이드 (22 x 40 x 0.1 mm) 위에 고정화하였다. 이에 앞서, 커버슬립 슬라이드는 피란하(piranha) 용액 (3:1 H₂SO₄/H₂O₂) 안에서 20분간 초음파 처리(sonication) 후에 3차 증류수를 이용하여 격렬히 세척하였다.

[0054] 약 30nm 크기의 구형 금 나노 입자를 포함한 용액은 흡광도 528nm에서 0.04가 되도록 희석한 뒤 drop-coating을 통해 유리 기판(슬라이드 글래스)에 물리적으로 흡착을 시켰다. 여기서, 금 나노입자의 농도와 인큐베이션 시간은 입자간 간격을 조절함으로써 입자간 커플링 효과를 감소시키는 역할을 한다.

[0055] 그 후, 준비한 유리 기판 샘플을 미세유체 이미징 챔버 (RC-30, Warner Instrument Inc.)에 장착시키고, 상기 이미징 챔버는 암시야 공명 현미경의 샘플 홀더에 삽입하였다. 이미징 챔버는 금 나노입자의 표면 기능화에 필요한 흡착물 및 반응물 등의 여러 가지 화학 물질을 주입하기 위한 수단으로, 주사기 펌프와 연결되어 있으며, 챔버 안으로 흐르는 유체의 속도는 100 μ l/min으로 조절하였다.

[0056] 금 나노입자 표면은 앵솔루트 에탄올(absolute ethanol) 용액을 흘려주어 세척한 다음, 3차 증류수를 주입하여 모든 불순물과 과정화가 되지 않은 금 나노입자를 제거하였다. 이 때 금 나노입자는 전기적으로 유리기판에 흡착되어 있을 수 있기 때문에 30분 이상 충분히 증류수를 주입시켜주었다 (도 1a 및 도 1b).

실시예 3

[0057] 특정 DNA와 p53 단백질의 선택적 결합력 분석용 나노 플라즈모닉 센서 제작

[0058] 3-1 : 나노 플라즈모닉 센서 제작

[0059] p53 단백질과 특정 DNA의 결합정도를 비교하기 위해 다음과 같은 방법으로 특정 DNA인 GADD45 promoter를 금 나노입자에 고정시켰다.

[0060] GADD45 promoter

[0061] [서열번호 1] GADD45 promoter UP

[0062] 5'-GTACAGAACATGTCTAAGCATGCTGGGGAC-3'

[0063] [서열번호 2] GADD45 promoter LO

[0064] 5'-GTCCCCAGCATGCTTAGACATGTTCTGTAC-3'

[0065] 먼저, 실시예 1에서 제조한 금 나노 입자가 고정화된 RC-30 closed bath 챔버안으로 싸이올기가 유도된 GADD45 promoter와 유기흡착제 (HS(CH₂)₁₁(OCH₂CH₂)₃OH)가 1 : 8의 물 비율로 혼합된 혼합물 200 μ l를 주입하여 12시간 동안 반응시킴으로써 GADD45 프로모터에 해당하는 DNA를 금 나노 입자 표면에 고정화시켰다. 반응 과정 이후에는 3차 증류수로 세척과정을 거쳐 미반응된 불순물들을 제거하였다. 금 나노입자 표면 개질 정도를 UV/VIS 분광 광도계로 측정한 결과(도 3), 개질하지 않은 금 나노입자 -> 표면 개질된 금 나노입자 -> DNA가 고정된 금 나노입자 순으로 장파장 쪽으로 피크가 이동된 것을 확인하였다.

[0066] 3-2 : 단일 나노 플라즈모닉 센서를 이용한 p53 단백질 검출 정도 확인

[0067] 상기 실시예 2의 방법으로 제조한 나노 플라즈모닉 센서에서 금 나노입자에 고정된 GADD45 promoter와 p53 단백질의 결합정도를 비교하기 위해 실시예 2-2에서 GADD45 promoter를 금 나노입자에 고정시키고 세척한 다음, 마지막으로 GADD45 promoter DNA에 선택적으로 결합하는 p53 단백질 200 μ l를 챔버에 주입하고, 2시간 동안 반응시켜 DNA와 단백질간의 결합을 유도하였다. 그리고 모든 반응이 이루어진 후에 결합하지 않은 p53 단백질은 증류수로 세척하였으며, 고정화가 이루어지는 각 단계마다 암시야 공명 현미경을 이용한 광 산란(Light scattering) 스펙트럼 측정하였다.

[0068] 그 결과, 고정화 단계마다 최대 파장이 오른쪽으로 이동함을 확인하였으며, 최대파장의 이동도 분석을 통해 결과적으로 GADD45 promoter에 결합하는 p53 단백질과의 상호작용을 비교 분석할 수 있는 것을 확인하였다 (도 4a 및 도b).

[0069] 이후, 단일 금 나노입자의 광학반응을 정확하게 측정하기 위해, background 스펙트럼과 암시야 공명 현미경 자체의 기계적으로 발생하는 노이즈 시그널을 측정하여 이를 제거한 스펙트럼 분석을 실시하였다.

[0070] 가장 먼저 dark field 상에 보이는 단일 금 나노 입자들 중 임의로 10~12개 정도의 입자들(도 2b)을 선정하여 스펙트럼을 측정하고, 타겟 물질들(GADD45 promoter, 야생형 p53 단백질 또는 돌연변이 p53 단백질)을 순차적으로 흘린 뒤, 각 스텝마다 같은 입자들에 한해서 스펙트럼을 측정하여 스펙트럼의 변화를 분석하였다. 이러한 과정은 각 단백질의 변이마다 반복한 후, 데이터의 프로세싱을 위해, 실험의 결과로 얻어진 스펙트럼에 OriginPro 8.0 프로그램의 Lorentzian 알고리즘을 적용함으로써 정확하고 효과적으로 Wavelength 최대 파장 값을 분석하였다. 마지막으로 단일 금 나노입자의 주위 굴절률 변화로부터 얻어진 LSPR 산란 최대 파장 이동 값($\lambda_{\max}$)은 하기 수학적 식 1로 계산하였다.

[0071]

[0072] [수학적 식 1]

[0073] $\Delta \lambda_{\max} = \lambda_{\max}(\text{after binding}) - \lambda_{\max}(\text{before binding})$

실시예 4

[0074] 야생형과 돌연변이형 단백질의 부착에 따른 빛 산란 스펙트럼의 이동 정도 분석 및 비교

[0075] GADD45 promoter와 실시예 1에서 분리한 p53 단백질(야생형/돌연변이형)의 결합력의 차이를 비교하기 위해 나노 플라즈모닉 센서를 이용한 빛 산란 스펙트럼의 이동 정도를 분석하였다.

[0076] 또한, GADD45 promoter와 p53 단백질(야생형/돌연변이형)이 선택적으로 결합하는 지에 대한 신뢰성 있는 분석을 위해서 대조군(control)로 GADD45 promoter와 결합하지 않은 SP6 RNA 폴리머레이즈(Promega Corporation)를 사용하였다.

[0077] 4-1 : 쥐의 p53 단백질(야생형/돌연변이형)의 결합력 차이 비교

[0078] 단일 금 나노입자에 GADD45 promoter를 결합시킨 후 GADD45 promoter에 선택적으로 결합하는 쥐의 p53 단백질(표 1)을 결합시키고, 스펙트럼을 측정하여 상기 수학적 식 1을 이용하여 단일 금 나노입자의 주위 굴절률 변화로부터 얻어진 LSPR 산란 최대 파장 이동 값($\lambda_{\max}$)을 계산하였다.

표 4

[0079] 쥐의 p53 단백질의 최대파장 이동 값

Type of p53 protein	Name of cell lines	$\Delta \lambda_{\max}(\text{nm})$	Compare with $\Delta \lambda_{\max}$ (wild type higher)
Mouse p53 protein	Wild type	9.6	-
	I252F	4.2	2.3
	R270H	1.7	5.6

[0080] 그 결과, 야생형 p53 단백질의 경우 스펙트럼의 최대 파장 값이 9.6nm 이동한 것을 확인하였으며, 돌연변이 p53(I252F 및 R270H) 단백질의 경우 스펙트럼의 최대 파장 값이 각각 4.2nm, 1.7nm가 이동하는 것을 확인하였다(도 5 및 표 4).

[0081] 또한, 대조군의 경우 스펙트럼의 최대 파장 이동 값이 거의 발생하지 않았으며, 이런 결과를 통해 나노 플라즈모닉 센서를 이용한 실험결과가 타당성과 신뢰성 있으며, p53 단백질을 선택적으로 구별할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0082] 4-2 : 사람 세포주에서의 단백질 전처리 과정

[0083] 정상적인 세포 성장 상태(Normal growth state)에 있는 암세포에 트립신을 처리하여(trypsinize) 세포 펠렛(cell pellet)을 수득한 다음, 세포 펠렛(cell pellet)에 라이시스 버퍼(lysis buffer)와 혼합한 후, 얼음(ice)에서 30분 동안 배양하였다. 그 다음, 원심분리 하여 상층액만 새로운 튜브(tube)에 옮긴 후에 상층액에 존재하는 단백질 농도를 브래드퍼드(Bradford) 정량법을 사용하여 농도를 정량하였다.

[0084] 4-3 : 사람 유방암 세포주의 p53 단백질(야생형 / 돌연변이형)의 결합력 차이 비교

[0085] 단일 금 나노입자에 GADD45 promoter를 결합시킨 후 GADD45 promoter에 선택적으로 결합하는 사람의 유방암 세포주(표 2)의 p53 단백질을 결합시키고, 스펙트럼을 측정하여 상기 수학식 1을 이용하여 단일 금 나노입자의 주위 굴절률 변화로부터 얻어진 LSPR 산란 최대 파장 이동 값($\lambda_{\max}$)을 계산하였다.

표 5

[0086] 사람 유방암 세포주의 p53 단백질의 최대파장 이동 값

Type of p53 protein	Name of cell lines	$\Delta \lambda_{\max}(\text{nm})$	Compare with $\Delta \lambda_{\max}$ (wild type higher)
Breast cancer Protein	ZR-75-1(wild type)	8.6	×
	MCF-7(wild type)	9.3	-
	T47D	1.2	7.8
	BT474	1.0	9.3
	SKBR3	0.64	14.5
	MDA-MB-231	2.66	3.5
	MDA-MB-435s	2.1	4.4

[0087] (야생형과 돌연변이 형의 최대파장 이동 값 비교는 MCF-7 값을 기준으로 비교)

[0088] 그 결과, ZR-75-1 및 MCF-7 세포주에서 분리한 야생형 p53 단백질의 경우 스펙트럼의 최대 파장 값이 각각 8.6m 및 9.3m 이동한 것을 확인하였으며, T47D, BT474, SKBR3, MDA-MB-231 및 MDA-MB-435s에서 분리한 돌연변이 p53 단백질의 경우 스펙트럼의 최대 파장 값이 각각 1.2m, 1.0m, 0.64m, 2.66m 및 2.1m 이동한 것을 확인하였다 (도 6a 및 표 5).

[0089] 4-4 : 사람 폐암 세포주의 p53 단백질(야생형/돌연변이형)의 결합력 차이 비교

[0090] 단일 금 나노입자에 GADD45 promoter를 결합시킨 후 GADD45 promoter에 선택적으로 결합하는 사람의 폐암 세포주(표 3)의 p53 단백질을 결합시키고, 스펙트럼을 측정하여 상기 수학식 1을 이용하여 단일 금 나노입자의 주위 굴절률 변화로부터 얻어진 LSPR 산란 최대 파장 이동 값($\Delta \lambda_{\max}$)을 계산하였다.

표 6

[0091] 사람 폐암 세포주의 p53 단백질의 최대파장 이동 값

Type of p53 protein	Name of cell lines	$\Delta \lambda_{\max}(\text{nm})$	Compare with $\Delta \lambda_{\max}$ (wild type higher)
---------------------	--------------------	------------------------------------	--

Lung cancer Protein	H460(wild type)	15	-
	H522	2.05	7.3
	H441	3.9	3.8
	Calu-3	2.9	5.2
	H1703	2.4	6.3

[0092] 그 결과, H460 세포주에서 분리한 야생형 p53 단백질의 경우 스펙트럼의 최대 파장 값이 15m 이동한 것을 확인하였으며, H522, H441, Calu-3 및 H1703에서 분리한 돌연변이 p53 단백질의 경우 스펙트럼의 최대 파장 값이 각각 2.05m, 3.9m, 2.9m, 2.66m 및 2.4m 이동한 것을 확인하였다 (도 6b 및 표 5).

[0093] 4-5 : 단백질의 아미노산 변이에 따른 돌연변이형 단백질 간의 중요도 비교

[0094] 본 발명의 나노플라즈모닉 센서를 이용하여 p53 단백질의 아미노산 변형에 따른 GADD45 프로모터와의 결합력 차이를 확인하기 위하여 광산란 스펙트럼의 파장 이동값을 비교 분석하였다.

[0095] 본 발명에서 사용된 유방암 p53 단백질 돌연변이 샘플 중 SKBR3의 경우 DNA binding domain 175 position에서 아미노산 arginine이 histidine으로 변이가 일어난 것으로, 상기 표 5에 나타난 바와 같이, 낮은 최대파장 이동값을 보이는 것으로 보아 중요한 부위에 돌연변이가 일어난 것을 확인할 수 있었다.

[0096] 또한 본 발명에서 사용된 폐암 p53 단백질 돌연변이 샘플 중 H522의 경우 DNA binding domain 191 position에서 p53이 deletion으로 유전자가 knock down된 것으로 가장 낮은 최대파장 이동 값(표 6)을 보이는 것으로 보아 다른 돌연변이형 단백질보다 결합력이 현저히 떨어진다는 것을 확인할 수 있다.

[0097] 즉, 돌연변이 p53 단백질과 야생형 p53 단백질의 최대파장 이동 값을 비교하여 수치화하였을 경우(Compare with $\Delta \lambda_{max}$), 가장 높은 값이 보이는 샘플이 중요한 부분에 돌연변이가 일어났다는 것을 의미하며, 본 발명의 나노플라즈모닉 센서를 이용하여 p53 단백질의 중요한 돌연변이 위치를 파악할 수 있는 것을 확인하였다.

실시예 5

[0098] **다양한 종류의 p53 단백질에서 순수 p53 단백질만의 상대적인 농도 값 비교**

[0099] 본 발명의 단일 나노 플라즈모닉 센서에 사용한 사람의 유방암, 폐암의 세포주 샘플의 경우 서로 다른 농도의 p53 단백질이 함유되어 있다. 총 단백질 농도는 동일하게 정량한 후 사용하였지만, 그 안에 포함된 순수 p53 단백질만의 농도는 야생형과 돌연변이형 단백질 사이에 낮은 농도로 존재하기 때문에 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 실험을 통해 정량화 하였다 (도 7a 및 도 7b).

[0100] 실험결과 p53 단백질의 농도는 0.57~1.20 ng/ul 범위에서 측정되었으며, 17.90nM 까지 검출 되었음을 알 수 있다. 또한, 각 샘플마다 농도의 큰 차이는 발견되지 않았으며, 도 7에서 보이는 상대적인 단백질 농도의 값에서 보이는 것과 같이 특정 샘플의 p53 농도가 높아서 광 산란 스펙트럼 최대 파장 값의 차이가 생기는 것이 아니라 단백질 변형의 유, 무에 따라 결합력 차이가 발생하는 것을 확인하였다.

실시예 6

[0101] **단일 나노 플라즈모닉 센서를 통해 얻은 단백질과 DNA의 결합력 차이의 결과와 전기 영동의 이동정도 분석 결과 비교**

[0102] 본 발명의 나노 플라즈모닉 센서를 통해 얻은 단백질과 DNA의 결합력 차이의 정당성을 확인하기 위해 EMSA(Electrophoretic mobility shift assays) 실험을 통해 결합력의 차이를 비교하였다.

[0103] 쥐 p53 단백질의 아미노산 돌연변이에 대한 EMSA 실험은 나노 플라즈모닉 센서 실험과 동일한 조건 하에서 개별적으로 측정하였다.

[0104] 야생형 p53 단백질, I252F 샘플 및 R270H 샘플의 결합력의 차이를 비교한 결과 각각 약 100%, 약 50% 및 약 0%

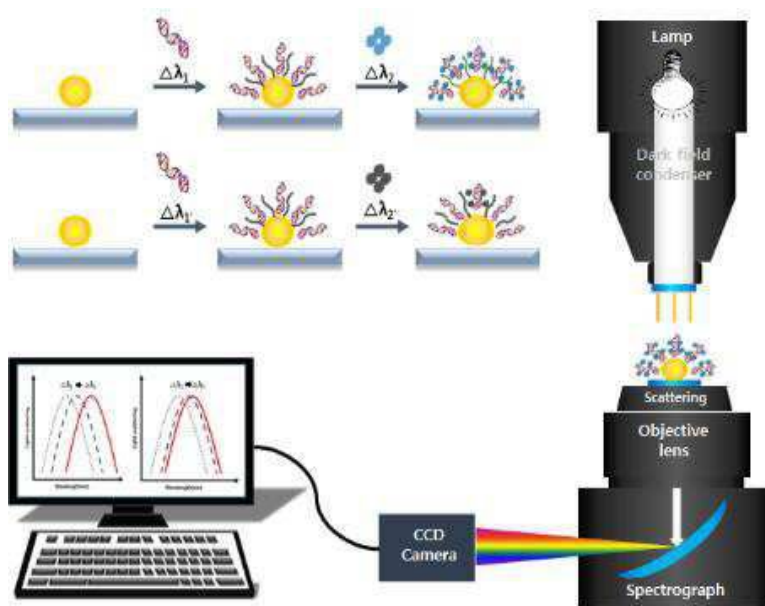
로 나타났으며(도 8), 도 5의 나노 플라즈모닉 센서의 광산란 분석 결과와 일치하는 것을 확인하였다.

[0105]

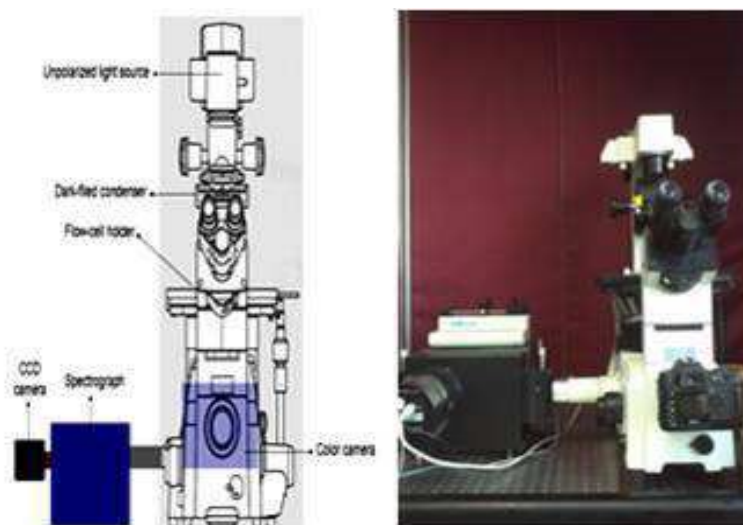
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

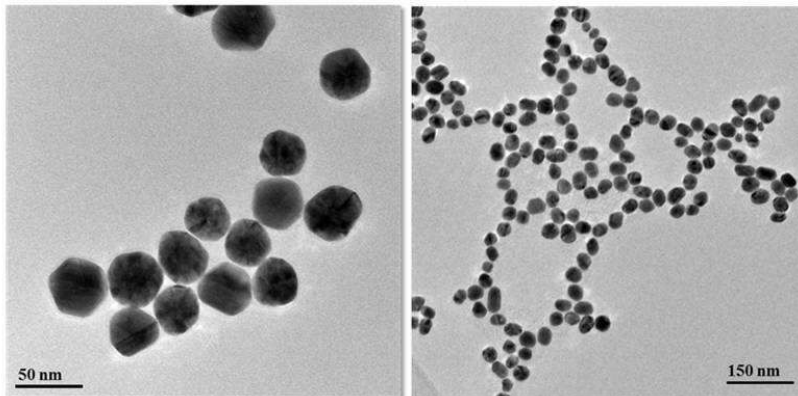
도면1a



도면1b



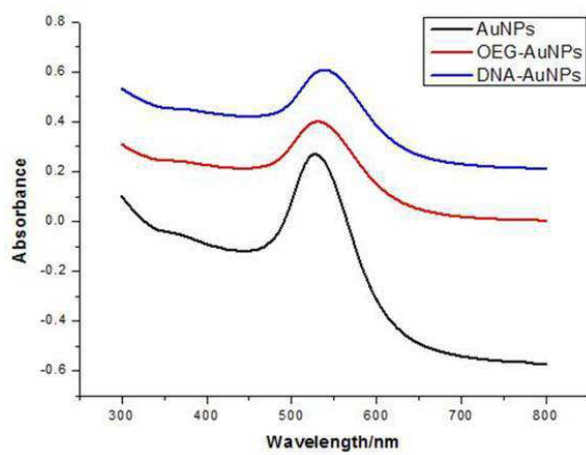
도면2a



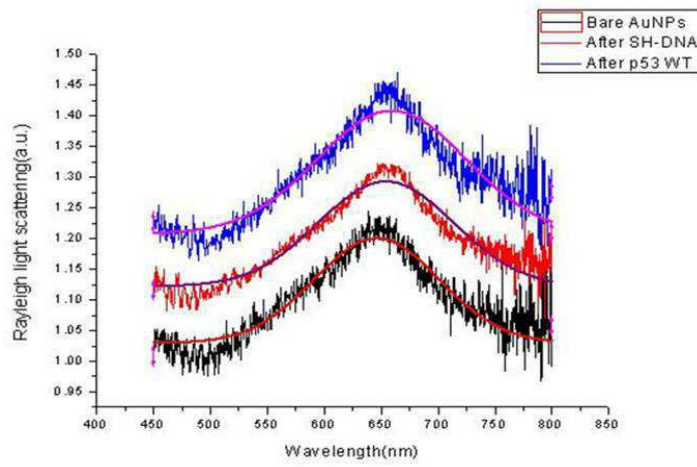
도면2b



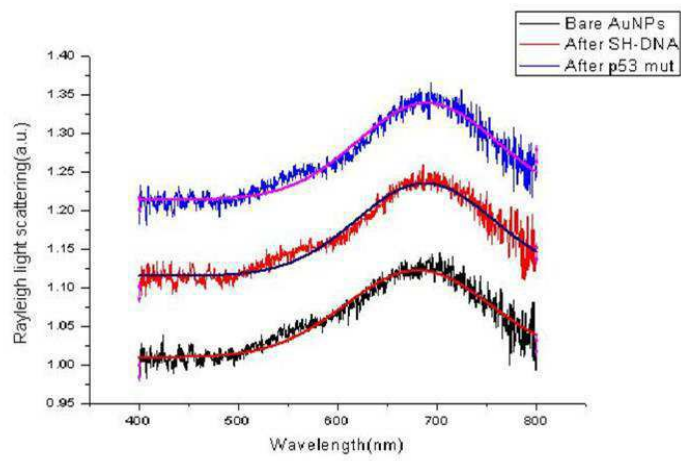
도면3



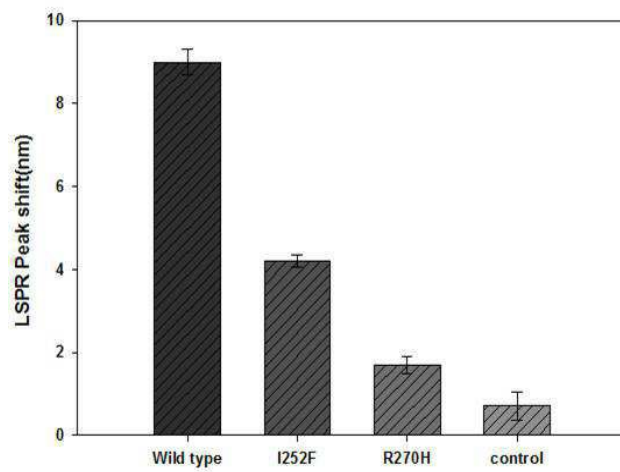
도면4a



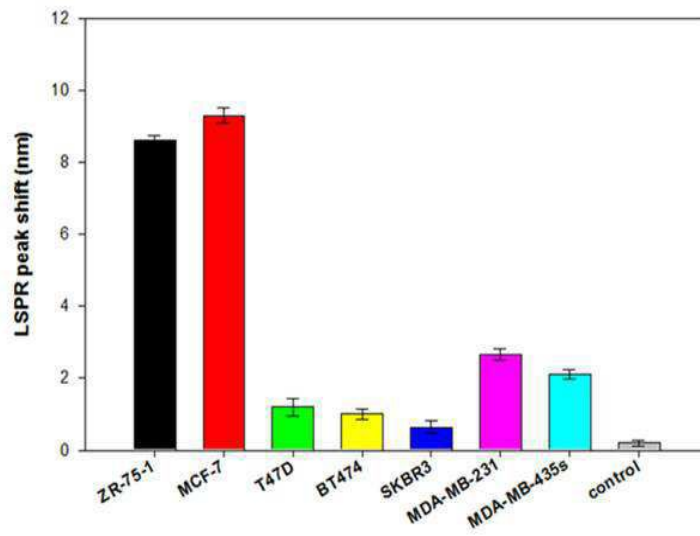
도면4b



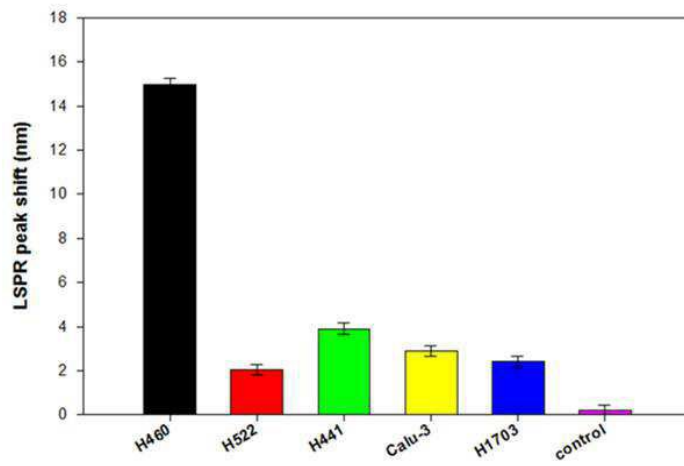
도면5



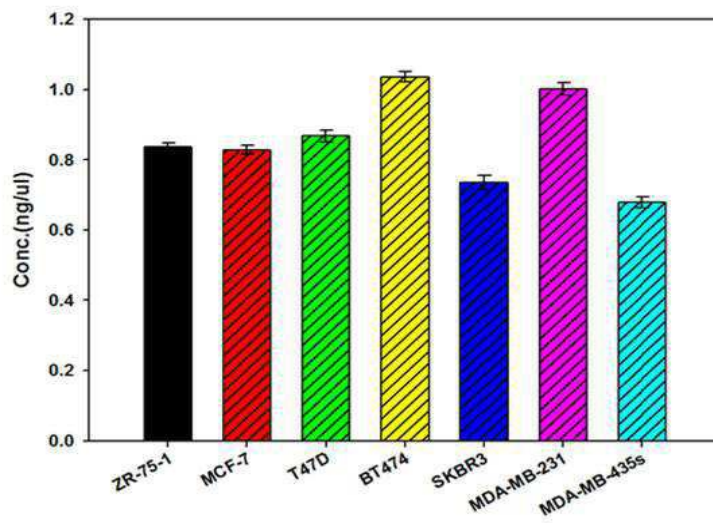
도면6a



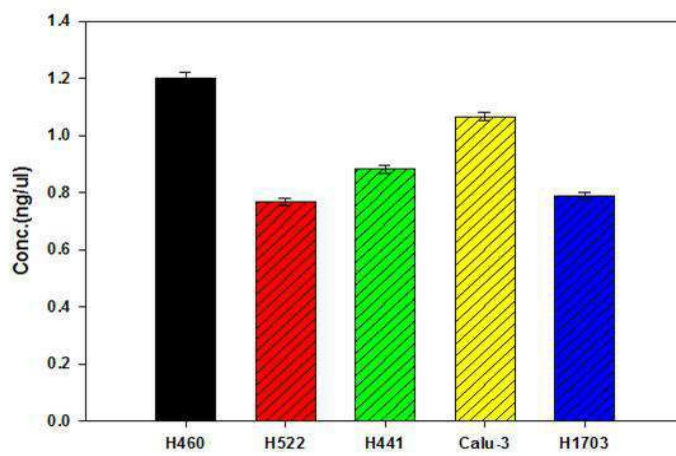
도면6b



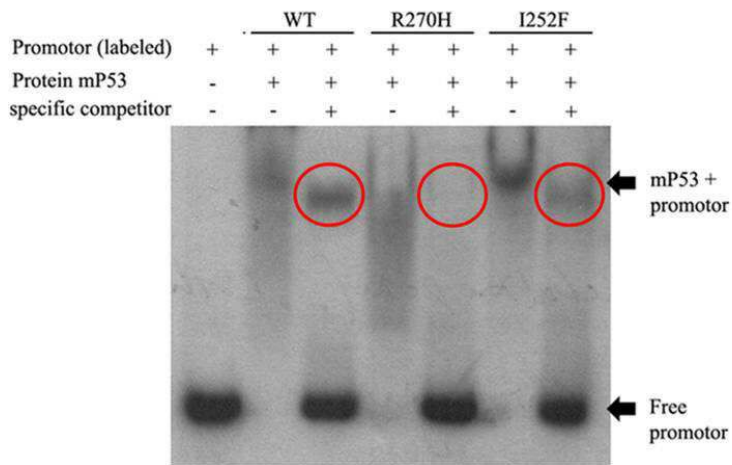
도면7a



도면7b



도면8



서열 목록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Analysis Method for DNA Interaction with p53 Protein Using Single Plasmonic Nanosensor

<130> P13-B326

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GADD45 promoter UP

<400> 1

gtacagaaca tgtctaagca tgctggggac

30

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GADD45 promoter LO

<400> 2

gtccccagca tgcttagaca tgttctgtac

30